



19)

(11) Publication number:

**02039896 A**

Generated Document.

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**(21) Application number: **63187281**(51) Intl. Cl.: **C12P 21/06 A23J 3/34 A61K 37/18 C12N 9/48**(22) Application date: **27.07.88**

(30) Priority:

(43) Date of application  
publication: **08.02.90**(84) Designated contracting  
states:(71) Applicant: **EZAKI GLICO CO LTD**(72) Inventor: **OKADA SHIGETAKA  
NAGAMORI YOICHI  
FUJISHIMA NOBORU**

(74) Representative:

**(54) LOW-MOLECULAR  
PEPTIDE COMPOSITION  
AND PRODUCTION  
THEREOF**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To improve absorption in intestinal tracts and nutrient effects by hydrolyzing an aqueous solution of a protein with an endopeptidase and dipeptidyl carboxypeptidase(DPCP).

**CONSTITUTION:** A culture obtained by culturing *Bacillus subtilis* HL521, strain, etc., is extracted and purified to afford DPCP having the following properties. Action; liberating peptides in dipeptide units of amino acids from the carboxy terminals of proteins. Optimum pH; 6.0-11.0. Action temperature; about 50°C. Molecular weight; 110000 measured by a gel filtration method, etc. Endopeptidase, a proline-specific endopeptidase, derived from *Flavobacterium meningosepticum*, etc., and the above-mentioned DPCP are then added to an

aqueous solution of soybean protein, etc., to carry out hydrolytic reaction at 25-60°C for 8-72hr and afford a hydrolyzed solution. The resultant hydrolyzed solution is subsequently purified to produce a low-molecular peptide composition having  $\leq 1000$  molecular weight.

COPYRIGHT: (C)1990,JPO&Japio

## ⑫ 公開特許公報(A)

平2-39896

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)2月8日

C 12 P 21/06  
 A 23 J 3/34  
 A 61 K 37/18  
 C 12 N 9/48  
 //(C 12 P 21/06  
 C 12 R 1:125)  
 (C 12 P 21/06  
 C 12 R 1:07)  
 (C 12 N 9/48  
 C 12 R 1:125)

6712-4B  
 7236-4B  
 8615-4C  
 7823-4B

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全4頁)

⑭ 発明の名称 低分子ペプチド組成物及びその製造方法

⑮ 特 願 昭63-187281

⑯ 出 願 昭63(1988)7月27日

⑰ 発 明 者 岡 田 茂 孝 奈良県生駒市東生駒3丁目207-269

⑰ 発 明 者 長 森 陽 一 大阪府大阪市阿倍野区美章園2丁目11-1

⑰ 発 明 者 藤 嶋 昇 大阪府大阪市生野区生野東4丁目6-38

⑰ 出 願 人 江崎グリコ株式会社 大阪府大阪市西淀川区歌島4丁目6番5号

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

低分子ペプチド組成物及びその製造方法

## 2. 特許請求の範囲

① タンパク質の水溶液をエンドペプチダーゼとジペプチジルカルボキシペプチダーゼ(以下、DPCPaseと略記する)とによって加水分解してなることを特徴とする低分子ペプチド組成物。

② タンパク質の水溶液にエンドペプチダーゼとDPCPaseとを添加してこれを加水分解することを特徴とする低分子ペプチド組成物の製造方法。

③ エンドペプチダーゼとしてプロリン特異的エンドペプチダーゼを使用することを特徴とする特許請求の範囲の①又は②記載の低分子ペプチド組成物又はその製造方法。

④ 加水分解の条件として温度25～60℃、8～72時間とすることを特徴とする特許請求の範囲の①又は②記載の低分子ペプチド組成物又はその製造方法。

⑤ エンドペプチダーゼとして通常のエンドペプ

チダーゼとプロリン特異的エンドペプチダーゼとを併用することを特徴とする特許請求の範囲の①又は②記載の低分子ペプチド組成物又はその製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## ① 産業上の利用分野

本発明は、ジペプチドを主成分とする低分子ペプチド組成物を酵素化学的に製造するものである。

## ② 従来の技術及び課題

腸管におけるタンパク質の吸収は、タンパク質が胃や腸のペロテアーゼでオリゴペプチドにまで分解された後、腸管上皮細胞のペプチダーゼで更に分解されて吸収されと考えられている。それゆえジペプチドやトリペプチドの吸収はアミノ酸に比べて非常に早期に行われるという報告もあり、これによればアミノ酸よりジ又はトリペプチドの方がより好ましいことになる。

従来、ジペプチドの製造方法は有機合成化学的な方法で行われている。しかしながら、この方法では、コストが高くつく上に副生物の除去が困難

であり、食品としての安全も問題があった。

また、各種の市販プロテアーゼ剤をタンパク質に作用させても良いが、この場合酵素剤中に含まれるペプチダーゼによりアミノ酸化されることが多い。たとえば、アスペルギルスオリゼ (*Aspergillus oryzae*) の酵素剤もアミノ酸生成性が強く、これによる大豆タンパク質分解物中のアミノ酸は40%にも及んでいる。

本発明は、有用なジおよびトリペプチドを主体とするペプチド混合物及びその新製造法に関するものである。

#### ③ 課題を解決するための手段

本発明はDPCPaseを有効に作用させジおよびトリペプチドを大量に生産することを目的にしている。更に具体的にいえば、DPCPaseとエンドペプチダーゼおよび場合によってはプロリン特異的エンドペプチダーゼを共存させタンパク質を分解する点にある。まずDPCPaseについてのべる。

DPCPaseは、たとえばバチルスズブチリス

ス (*Bacillus subtilis*) HL 521株 (微生物研究所寄託第10005号) 又はバチルスプミルス (*Bacillus pumilus*) HL 721株 (微生物研究所寄託第10006号) を通常の培養法により培養して生成させることができるものである。なお、そのDPCPaseの性質は次の通りである。

#### I) 作用

本酵素をAla-6 (アラニン6個よりなるペプチドをAla-6と略記し、同様に例えばアラニン2または3個よりなるものをAla-2, Ala-3のごとく略記する。以下同じ) に作用させるとカルボキシ末端よりAla-2づつに切断するほか、アンジオテンシンI (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) のカルボキシ末端からHis-Leuを遊離する。また、ブラジキニン (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) をArg-Pro-Pro, Gly-Phe, Ser-Pro, Phe-Argに分解した。すなわち、本酵素はタンパク質のカルボキシ末端よりアミノ酸の種類を問わずジペプチド単位

でペプチドを遊離する。しかしながら、カルボキシ末端より2番目にプロリンがあった場合は切断しない。

#### II) 至適pH及び安定pH

バチルスズブチリスHL 521株のものは、pH 6.0-11.0の間で安定であり、至適pHは、7.5である。

バチルスプミルスHL 721株のものは、pH 5.5-9.0の間で安定であり、至適pHは7.5である。

#### III) 作用温度

バチルスズブチリスHL 521株、バチルスプミルスHL 721株共に酵素の作用最適温度は50℃で、pH 7.0、60分処理を条件として45℃まで安定であった。

#### IV) 分子量

ゲル濾過法により、バチルスズブチリスHL 521株のものは、110,000 バチルスプミルスHL 721株のものは、155,000であった。

#### V) 活性測定方法

10 mM ベンゾイル-グリシル-アラニル-プロリン 0.1 mL に 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.05 mL と酵素液 0.05 mL を加え、40℃で15分反応させ、生ずるアラニル-プロリンをニンヒドリン法で定量した。

上記反応で1分間当たり1 μmoleのアラニル-プロリンを生成する酵素量を1単位とした。

以上はバチルスズブチリス及びバチルスプミルスの例であるが、本願においては必ずしもこれらに限定されない。たとえば、上記以外にもウサギの肺に由来するもの、ブタの腎臓、エシェリヒアコリ (*Escherichia coli*)、コリネバクテリウムイクイ (*Corynebacterium equi*) 等の起源のものも本願においてやはり有効に利用できるものである。

次にエンドペプチダーゼであるが、このものはプロリン特異的エンドペプチダーゼを除いて通常のエンドペプチダーゼが採用される。オリゴペプチドを大量に生成し、かつアミノ酸を余り生成し

ないものがよい。プロリン特異的なエンドプロテアーゼの起源もフラボバクテリウム メニンゴセプチカム (*Flavobacterium meningosepticum*) のほか、たとえば羊の腎臓由来の如きも使用できる。

エンドペプチダーゼも D P C P a s e も共に作用温度、作用時間、使用量(力価)、p H 等において格別制限はない。その作用可能範囲内において適宜に定めればよい。

エンドペプチダーゼ、プロリン特異性エンドペプチダーゼ及び D P C P a s e の作用順序も任意であるが、一般的にはエンドペプチダーゼ、プロリン特異性エンドペプチダーゼ、D P C P a s e の順に作用させるのが普通である。

なお、基質であるタンパク質はその起源、品種等を問わずいずれも採用される。たとえば大豆タンパク質、小麦タンパク質、乳タンパク質又は卵白などである。

#### ④ 作用

バチルス ズブチリス及びバチルス プミルス

の産生する D P C P a s e は本発明者によってカルボキシ末端からアミノ酸2個単位で作用しジペプチドを生成することが明らかになった。すなわち、前述の③課題を解決するための手段の項において酵素の作用として述べたように A l a - 6 を3個の A l a - 2 に、ブラジキニン<sup>6</sup>を3個のジペプチドと1個のトリペプチドに切断する。しかし、アンジオテンシン I の例にみられるようにカルボキシ末端より2番目にプロリンが存在すると反応は進行しない。このことは、A l a - A l a - P r o - A l a に作用しないことから一般的性質といえる。

この反応の阻害を克服するため本発明者は種々検討の結果フラボバクテリウム メニンゴセプチカムに代表されるプロリン特異性エンドペプチダーゼを共存させまたは予め作用させると再び D P C P a s e の作用が始まることを発見した。

上記のように D P C P a s e とプロリン特異性エンドペプチダーゼを共同作用させれば理論上は蛋白質をすべてジペプチドに分解することができる。しかし実際に各種のペプチドやカゼインなどの高

分子タンパク質に作用させるとペプチドに比べ著しく作用が劣り、場合によってはほとんど作用しない。この原因について種々検討を行ったところ、エンドプロテアーゼを作用させ、オリゴペプチド化した後、D P C P a s e ならびにプロリン特異性エンドペプチダーゼを作用させると効率よくジおよびトリペプチドが生成することが判明した。

#### ⑤ 実施例

##### 実施例 1

1 % ペプトン、0.5 % 酵母エキス、0.5 % 食塩を含む培地を p H 7.3 に調整し、殺菌後バチルス ズブチリス H L 5 2 1 株を接種し、37℃・16時間培養する。培養後、遠心分離により菌体を得、10 m M リン酸緩衝液で懸濁し超音波で菌体を破砕した。さらに遠心分離により菌体破砕物を除去した。

上澄液には D P C P a s e 0.03 U / m l を含んでいた。この上澄液を Q - セファロース、ハイドロキシルアパタイト、T S K - g e l C 3 0 0 0 S W X しなどの各種クロマトグラフィーにより精製

した。得られた精製酵素はゲル電気泳動によって単一のタンパク質の挙動を示した。収率は約1%であった。

##### 実施例 2

バチルス プミルス H L 7 2 1 株を実施例1と同組成の培地で同一条件にて培養した。同様の精製条件にて同様の作用を示す酵素を得ることができた。収率は1.5%であった。

##### 実施例 3

1 g のオボアルブミンを100 m l の水に溶解しバチルス ズブチリスのエンドペプチダーゼ0.1 g を加え40℃・4時間作用させた。100℃に加熱しエンドペプチダーゼを失活させた後、プロリン特異性エンドペプチダーゼ5 U を加え40℃16時間作用させた。100℃に加熱しプロリン特異性エンドペプチダーゼを失活させた後、D P C P a s e 0.5 U を加えさらに40℃で16時間反応させた。

それぞれの段階に於ける反応物のゲル濾過法による分子量の割合を表1に示す。

表1 基質の分解度

供試々料採取時期	基質の分子量	
	1000以上	1000以下
エンドペプチダーゼ 作用後	70%	30%
プロリン特異的 エンドペプチダーゼ 作用後	50%	50%
D P C P a s e 作用後	5%	95%

以上のように分子量1000以下の低分子量のペプチドを主成分とする組成物を得ることができた。

#### ③ 本発明の効果

本発明に使用の酵素の特異性から、本発明の低分子組成物は、ジペプチドを主成分とするので、経口投与した場合、腸管において速やかに吸収されやすいものであり、栄養的にみてすぐれたものである。

特許出願人 江崎グリコ株式会社